

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-085755

(43)Date of publication of application : 27.03.1990

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

G01N 33/543

(21)Application number : 63-236496

(71)Applicant : TEIJIN LTD

(22)Date of filing : 22.09.1988

(72)Inventor : KATSUBE TERUAKI
KAWAGUCHI TAKEYUKI
JO HISASHI

(54) IMMUNE SENSOR AND DETECTION OF IMMUNE REACTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To prevent the generation of electric signal noises at the time of directly detecting an antigen or antibody by adopting the constitution having a working electrode provided with a gelatinous electrolyte layer further on an electrode fixed with the antigen or antibody.

CONSTITUTION: The surface film potential of the working electrode changes with the antigen-antibody reaction on the working electrode when the element formed by fixing the antibody or antigen on the working electrode comes into contact with a specimen liquid contg. the antigen or antibody. As a result, the change rate of the film potential is measured directly or after conversion to current, by which the detection of the antigen or antibody is fundamentally enabled. The generation of spike noises is obviated in spite of a low ion concn. in the specimen liquid if the semi-solid electrolyte layer is provided on the electrode. The so-called ion shielding effect that the change in the surface potential of the film generated by the antigen-antibody reaction is decreased by the ions in the specimen liquid is suppressed and the sensitivity as the sensor is eventually improved. The material to form the gelatinous layer refers representatively to hydrophilic high-polymer gels, more specifically to natural high polymer compds. such as agar.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑯ 公開特許公報(A)

平2-85755

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑰ 公開 平成2年(1990)3月27日

G 01 N 27/327
33/543

Z 7906-2G
7363-2G

G 01 N 27/30 357

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全4頁)

⑱ 発明の名称 免疫センサ及び免疫反応検出方法

⑲ 特 願 昭63-236496

⑳ 出 願 昭63(1988)9月22日

㉑ 発 明 者 勝 部 昭 明 埼玉県浦和市下大久保255 埼玉大学工学部内
㉒ 発 明 者 川 口 武 行 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社東京研
究センター内
㉓ 発 明 者 城 尚 志 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社東京研
究センター内
㉔ 出 願 人 帝 人 株 式 会 社 大阪府大阪市東区南本町1丁目11番地
㉕ 代 理 人 弁 理 士 前 田 純 博

明 細 書

1. 発明の名称

免疫センサ及び免疫反応検出方法

2. 特許請求の範囲

1. 電極。その上又は中に形成された抗原又は抗体含有層及び更にその上に形成されたゲル状電解質層からなる作用電極を有する免疫センサ。
2. 当該電極が金属成形物及びその上に形成されたピロール、アニリン、チオフェンおよびそれらの誘導体から選ばれた化合物の重合体層からなり、かつ抗原又は抗体含有層が、上記重合体層が抗原又は抗体を含有せしめられてなる層である請求項1の免疫センサ。
3. 当該作用電極がMOSFETのゲート領域を構成している請求項1又は2の免疫センサ。
4. 当該作用電極がMOSFETのゲート部分以外に導電性配線を介して分離して設けられている請求項1～3記載のいずれかの免疫セ

ンサ。

5. 比較電極が当該作用電極の抗体または抗原物質を不活性化したものである請求項1～4記載のいずれかの免疫センサ。
6. 当該作用電極と比較電極との間の電位差を増幅して、電圧、電流または電荷量として検出する手段を有する請求項1～5記載のいずれかの免疫センサ。
7. 抗体または抗原を固定した作用電極と参照電極とを抗原または抗体を含む被検体水溶液と接触させ、当該作用電極上での抗原抗体反応に伴う電位変化を電位変化、電流変化または電荷量変化として検出する免疫反応検出方法。

3. 発明の詳細な説明

[発明の技術的分野]

本発明は新規な免疫センサ、および希薄濃度の抗原または抗体を短時間で検出できる免疫反応検出方法に関する。

[発明の背景]

(2)

近年、被検体液中に含まれる微量の抗原または抗体を検出する種々の方法が提案されている。それらは大別すると、標識剤を用いる方式と標識剤を用いない方式とに分類される。標識方式の具体例としては、酵素免疫法 (EIA)、放射性同位元素標識免疫法 (RIA)、蛍光色素標識免疫法 (FIA) などが知られている。これらは一般に煩雑な操作手順や発色試薬または特殊な設備を必要とする欠点があった。

一方、非標識免疫法としてはこれまで、膜表面に抗体または抗原を固定化し、抗原抗体反応後の膜表面電位を測定する膜電位方式 (例えば、相沢、鈴木ら、J. Membr. Sci., 2 (1977) 125参照) と金属電極表面に直接または膜を介して抗体あるいは抗原を結合し、抗原抗体反応に伴う電極電位の変動を電極電位測定法 (例えば、山本、坪村ら日本化学会誌、(1980) 1562参照) とが提案されている。これらの免疫電極は抗原または抗体を直接、簡便に測定できるがいずれも応答時間が30分以上かかり、検出される電気信号の強度も一般に

低い。さらに具体的な問題点として、抗体や抗原が固定された電極に被検体液を触れさせて抗原抗体反応を起こすに際して、上記電極を被検体液中に浸漬して攪拌すると、必要とされる被検体量が多くなり、攪拌に伴う電気信号ノイズやドリフトも発生しやすい。また、上記電極上に少量の被検体液を滴下して検出を行う場合も、滴下に伴う電気信号ノイズの発生が見られ再現性の良い安定な検出を行うことが困難であった。

〔発明の構成〕

本発明はかかる状況に鑑みてなされたものである。すなわち、本発明者らは抗原や抗体を直接、簡便に検出するに当たり、電気信号ノイズの発生を伴わないようにする方法を鋭意検討の結果、本発明に到達したものである。すなわち、本発明は

1. 抗原または抗体を固定した電極上に更にゲル状電解質層が設けられた作用電極を有する免疫センサ、
2. 当該作用電極が、金属電極、およびその上に形成されたピロール、アニリン、チオフェ

ンおよびそれらの誘導体から選ばれた化合物のポリマーから成る導電性高分子、およびそのポリマーに包括固定された抗原または抗体からなる上記免疫センサ、

3. 当該作用電極が、MOSFETのゲート領域に設けられたピロール、アニリン、チオフェンおよびそれらの誘導体から選ばれる化合物のポリマーから成る導電性高分子、およびそのポリマーに包括固定された抗原または抗体からなる上記免疫センサ、
4. 当該作用電極がMOSFETのゲート部分以外に導電性配線を介して分離して設けられている上記1～3項記載の免疫センサ、
5. 比較電極が当該作用電極の抗体または抗原物質を不活性化したものである上記1～3項記載の免疫センサ、
6. 当該作用電極と比較電極との間の電位差を増幅して、電圧、電流または電荷量として検出する手段を有する上記1～5項記載の免疫センサ、および

7. 抗体または抗原を固定した作用電極と参照電極とを抗原または抗体を含む被検体水溶液と接触させ、当該作用電極上での抗原抗体反応に伴う電位変化を電位変化、電流変化または電荷量変化として検出する免疫反応検出方法

である。

本発明において用いられる作用電極としては数 μ V～数mVの電位変化を検出でき、界面電位の安定したものであれば使用できる。具体的な例としては、白金、金、パラジウム、ニッケル、カーボン、クロム、タンタル、イリジウムなどが挙げられる。これらの金属電極の形態は平板、多孔質体、フィラメントおよびスポンジなどのいずれでも構わない。また、これらの金属は直接、作用電極として用いることはもちろん、電界効果型トランジスタ (FET) のソースおよびドレイン電極として用いることも可能である。本発明の作用電極としては金および白金が好ましい。また、ゲート部に金属を用いる場合は金、白金以外にイリジ

ウムも好適に用いられる。これらのゲート金属はFETチップから分離されたいわゆる分離ゲート型FETとして用いることも可能である。本発明に用いられる比較電極用の金属としては、本質的には上記作用電極に用いた金属が使用できる。好ましくは、比較電極と作用電極の金属は同一である。作用電極上には抗体または抗原が固定されており、比較電極上には活性を無くした上記の抗体および抗原が固定される。

次に、本発明に用いられる抗体や抗原物質は、免疫反応に関わるものであって分子内にイオン性基を有し、 $100\mu V$ 以上、好ましくは $1mV$ 以上の膜電位を示すIgG、IgA、IgE、IgM等の免疫グロブリンや絨毛性性腺刺激ホルモン(HCG)、ガン胎児性抗原(CEA)などが挙げられ、抗体としては、これらの抗原に対するポリクローナル又はモノクローナルな抗体が用いられる。

これらの抗原および抗体分子は、単独でまたは他の物質分子と組み合わせて薄膜状にしたのち前

り生じた膜の表面電位変化が検体液中のイオンによって低減される、いわゆるイオンシールド効果を抑えられる結果、センサーとしての感度の向上につながる事が判明した。このゲル状膜を形成する物質とは、親水性高分子ゲルが代表的なものであり、具体的には寒天、アルギン酸ナトリウム、グアーガム、カラギーナン、ゼラチンなどの天然高分子化合物；およびポリアクリル酸イオン架橋体、グルタルアルデヒドとポリアミンの架橋反応物、ポリアクリルアミドゲル、塩基性ポリカチオンと強酸性ポリアニオンとのポリイオンコンプレックスが挙げられる。これらはゲル化する前に作用電極上に塗布してゲル膜を形成させる。このゲル膜形成に先立って、上記ゲル膜形成性物質の水溶液中には、予め緩衝液成分や血清アルブミンが添加される。該ゲル膜の形成は通常、常温 $\sim 50^{\circ}C$ で30分以内に完了する。作用電極上に固定した抗体または抗原の活性低下を避けるために、ゲルの形成条件はなるべく温和な方がよい。また、ゲル膜の厚みはとくに制限されないが、好ましくは

(3) 記の作用電極上に固定される。該電極上への抗体および抗原の固定化法としては、浸漬吸着法、流延法、ラングミュア・ブロージェット法や導電性高分子の形成と同時に該高分子中に包括固定する方法などが採用される。かくして、作用電極上に抗体または抗原が固定された素子が、抗原または抗体を含む被検体液と接触すると、該作用電極上での抗原-抗体反応に伴って、その表面膜電位が変化する。その結果、該膜電位変化量を直接、または電流に変換して検出することにより抗原や抗体の検出が原理的には可能となる。しかしながら、前述したとおりこの膜電位変化を検出するに当り、ノイズやドリフトの発生が見られ、特に微小信号の検出の際にはこのノイズ発生によるS/N比の低下が問題であった。これを解決するために、上記の作用電極上にゲル状電解質層を設けることが本発明の特徴である。

すなわち、半固体状の電解質層を電極上に設けると、検体液中のイオン濃度が低くてもスパイクノイズが発生しない。従って抗原・抗体反応によ

$0.1\sim 10\mu m$ 、さらに好ましくは $0.5\sim 5\mu m$ の範囲が採用される。ゲル膜の厚みがこれ以上になると被検出成分の拡散が遅くなり、検出に時間がかかる。また、ゲル膜の厚みが $0.1\mu m$ 未満になるとゲル膜を設けた効果が観測されなくなる。かくして、電解質を含んだゲル膜が前記作用電極上に形成される。このゲル膜上で抗原抗体反応を行うと、後述の実施例にも見られる様に電気信号ノイズが発生しにくい。抗原抗体反応を該作用電極上で行うに際しては、被検体液中に上記電極を挿入して検出を行うことも可能であるが、好ましくは少量の上記検体液を該作用電極上に滴下して検出を行う方が効率的である。

かくして、本発明によれば実質的に $10\sim 100\mu l$ の被検体液で検出を行うことも充分可能であり、その検出感度領域も $10^{-2}\sim 10^{-9}g/ml$ と極めて広い。また、検出に要する時間も $5\sim 30$ 分間と比較的短い。以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明する。

参考例 1

(ヒト Ig G とアラキンをメチルとの混合単分子膜およびラングミュア・ブロージェット膜の作成)

テフロンコートした水槽中に二回蒸留水を満たし、その表面にアラキンをメチルのクロロホルム溶液 (0.5 mg/ml) を 100 μ l 展開し、単分子膜を形成した。その後、水槽中にヒト Ig G を全体の濃度が 10 μ g/ml になる様に注入したのち、上記単分子膜を 10 μ N/cm² に圧縮した状態で 1 時間整地した。かくして水中にヒト Ig G の一部を上記単分子膜中に吸着固定した後、ラングミュア・ブロージェット法により該単分子膜を本発明の電極基板上に転写した。

実施例 1

スライドガラス基板上に白金を薄膜状にスパッタして電極板とした。この上に、前記参考例 1 に示した方法によって作成したヒト Ig G とアラキンをメチルとの混合単分子膜をラングミュア・ブロージェット法で二層累積し、リン酸緩衝液で充

(4)

分洗浄した。同一寸法の上記電極を二枚作成し、一方の電極はそのまま作用電極用として用い、もう一方の電極はその上に固定したヒト Ig G を紫外線照射により失活させた後、比較電極として用いた。次に、25 ml のリン酸緩衝液 (pH 6.8) と牛血清アルブミンを混合した 0.7 重量% の寒天水溶液を上記作用電極用電極上に塗布したのち、室温にて放置することによりゲル化させた。このゲル上に 10^{-9} モル/l の抗ヒト Ig G 溶液を 5 μ l 滴下したところ、何らノイズ信号の発生を伴わずに 10 分後に 1 mV の表面電位変化が観測された。

比較例 1

実施例 1 において寒天ゲルを用いることなく、同一の実験を行ったところ、非常に大きなスパイク状のノイズ信号が発生し、抗 Ig G の検出は不可能であった。

実施例 2

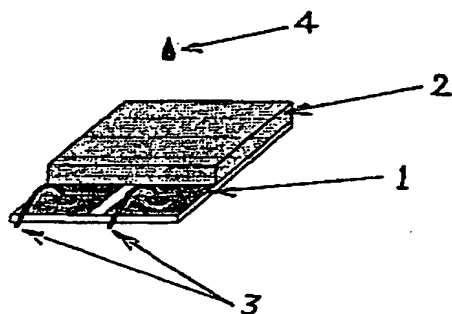
実施例 1 において、ヒト Ig G を混合単分子膜

方で電極上に固定する代わりに、ヒト Ig G (10 mg/ml)、ピロール (0.5 モル/l) および塩化カリ (0.1 モル/l) を常法に従い定電位重合 (0.65 V、通電量 0.2 クロウン/ml、重合温度 25℃) を行うことにより、電極上に形成したポリピロール膜中に固定した。この作用電極用電極上に実施例 1 と同様に寒天ゲル膜を設けて、抗ヒト Ig G の検出を行ったところ、ノイズ信号の発生を伴うことなく、 10^{-9} モル/l の濃度まで検出可能であった。

4. 図面の簡単な説明

図 1 は本発明の免疫センサの 1 例を示すものである。図中、1 はヒト Ig G が固定された電極、2 はゲル状電解質層、3 は電極リード線、4 は被検液体である。

図 1



特許出願人 帝人株式会社
代理人 弁理士 前田 純 博

